
ECOLOGIA

Emily Della Costa Pinheiro Pinto

**TOXICIDADE DE PETRÓLEO BRUTO SOBRE
MICROCRUSTÁCEO *Daphnia similis* EM ÁGUA DE
RIO E ÁGUA DE PRODUÇÃO DE PETRÓLEO**

Emily Della Costa Pinheiro Pinto

TOXICIDADE DE PETRÓLEO BRUTO SOBRE
MICROCRUSTÁCEO *Daphnia similis* EM ÁGUA DE RIO E
ÁGUA DE PRODUÇÃO DE PETRÓLEO

Orientador: Dejanira de Franceschi de Angelis

Co-orientador: Dilza Aparecida Nalin de Oliveira Leite

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de
Rio Claro, para obtenção do grau de Ecólogo.

Rio Claro
2013

574.5 Pinto, Emily Della Costa Pinheiro
P659t Toxicidade de petróleo bruto sobre microcrustáceo
Daphnia Similis em água de rio e água de produção de
petróleo / Emily Della Costa Pinheiro Pinto. - Rio Claro, 2013
45 f. : il., figs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (Ecologia) - Universidade
Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Dejanira de Fransceschi de Angelis
Coorientador: Dilza Aparecida Nalin de Oliveira Leite

1. Ecologia. 2. Contaminação ambiental - Avaliação. 3.
Ecotoxicidade. 4. Bioindicadores de toxicidade. 5. Indústria
petrolífera. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de tudo a Deus por me manter no caminho correto, pela força e pelas bênçãos recebidas, sem Ele nada seria possível.

Aos meus pais pelo amor, pela educação, pela presença e pelo apoio em todos os momentos da minha vida.

A Professora Dejanira Franceschi de Angelis pela orientação, dedicação, paciência, compreensão e por todo o auxílio nas horas mais difíceis.

Ao Programa de Formação de Recursos Humanos em Geociências e Ciências Ambientais Aplicadas ao Petróleo – PRH 05/UNESP, ao PFRH/Petrobrás e ao PRH/ANP – FINEP/MCT, pelo apoio acadêmico e financeiro, indispensáveis à realização deste trabalho de conclusão de curso.

Ao Prof. Dr. Dimas Dias Brito pela bolsa de estudo e pela dedicação a esse programa tornando-o cada vez melhor.

A professora Dilza, pela coorientação deste trabalho, pela amizade e por muitas vezes ter intermediado meus recados à professora Dejanira.

A REPLAN e ao CENPES pelo fornecimento das amostras.

Ao Zito, por me ensinar a cuidar das *Daphnias*, pela coleta das amostras, preparo das águas e das algas, e pelo trato delas na minha ausência.

A todos do Laboratório de Toxicidade de Águas: Inês, Lú, Marcio Rozin, Marcio Ramos, Mariane, Nair, Leticia e Sibeli pela amizade e pelos aprendizados durante esses anos.

A toda turma de ecologia de 2009, pela amizade, pelas risadas, pelos apuros enfrentados nos campos e pela companhia durante esses quatro/cinco anos de faculdade. Vou sentir muita falta de vocês.

A Debora minha companheira de moradia pela amizade e companhia durante esses anos da graduação.

O RIO E O OCEANO

Diz-se que, mesmo antes de um rio cair no oceano
ele treme de medo.

Olha para trás, para toda a jornada, os cumes, as montanhas,
o longo caminho sinuoso através das florestas,
através dos povoados, e vê à sua frente um oceano tão vasto
que entrar nele nada mais é do que desaparecer para sempre.
Mas não há outra maneira. O rio não pode voltar.

Ninguém pode voltar. Voltar é impossível na existência.

Você pode apenas ir em frente.

O rio precisa se arriscar e entrar no oceano.

E somente quando ele entra no oceano é que o medo desaparece.

Porque apenas então o rio saberá que não se trata de desaparecer no oceano,
mas tornar-se oceano.

Por um lado é desaparecimento e por outro lado é
renascimento.

Assim somos nós.

Só podemos ir em frente e arriscar.

Coragem! Avance firme e torne-se Oceano!

Osho

RESUMO

Os ecossistemas aquáticos sofrem muitos impactos causados pela ação antrópica resultantes das atividades que ocorrem ao seu redor. Com o progresso tecnológico observado nos últimos anos, esse ambiente tem recebido grande quantidade de agentes químicos provenientes das indústrias, agricultura e área urbana que acabam afetando a biota aquática. Dentre essas fontes de contaminação, a indústria petrolífera tem contribuído para a poluição dos ambientes aquáticos tanto com a geração de efluentes como a água de produção como também com derramamentos de petróleo e seus derivados, que apresentam toxicidade para diversos organismos. Com toda essa problemática ambiental tem aumentado a preocupação com a qualidade da água e tem sido utilizados ensaios ecotoxicológicos com organismos de ecossistemas aquáticos para avaliar a toxicidade dos produtos químicos presentes no meio hídrico. Neste contexto o microcrustáceo *Daphnia similis* destaca-se como um organismo de água doce muito representativo da fauna aquática de rios e de alta sensibilidade a impactos ambientais. Desta forma o presente estudo objetivou avaliar a toxicidade letal do petróleo bruto e da água de produção sobre este microcrustáceo. Os resultados mostraram que o microcrustáceo apresentou grande sensibilidade aos contaminantes principalmente ao petróleo bruto. Houve também influência das variáveis ambientais pH e temperatura sobre a sobrevivência dos organismos.

PALAVRAS-CHAVE: Petróleo bruto, água de produção, *Daphnia similis*, toxicidade

ABSTRACT

Aquatic ecosystems are suffering many impacts caused by human activities resulting from the activities occurring around them. With technological progress observed in recent years, this environment has received large amounts of chemicals from industries, agriculture and urban area that affect the aquatic biota. Among these sources of contamination, the oil industry has contributed to the pollution of aquatic environments with both effluents as produced water well as oil spills and their derivatives having toxicity to various organisms. With all the environmental issues has increased concern about water quality and has been used ecotoxicological tests with aquatic organisms to ecosystems to assess the toxicity of chemicals present in the water. In this context the microcrustacea *Daphnia similis* stands out as a freshwater organism very representative of the aquatic fauna of rivers and high sensitivity to environmental impacts. Thus, the present study aimed to evaluate the lethal toxicity of crude oil and produced water on this microcrustacea. The results showed that the microcrustacea presented high sensitivity to contaminants primarily crude oil. There was also the influence of environmental variables pH and temperature on the survival of organisms.

KEYWORDS: crude oil, produced water, *Daphnia similis*, toxicity

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais acidentes na área petrolífera ocorridos no mundo desde 1967.....	12
Tabela 2: Composição elementar do petróleo	14
Tabela 3: Classificação dos tipos de óleo.....	14
Tabela 4: Classificação dos hidrocarbonetos de acordo com sua massa molecular.....	15
Tabela 5: Classificação do petróleo de acordo com a persistência no ambiente.....	16
Tabela 6: Caracterização da água de produção do Terminal Marítimo Almirante Barroso (TEBAR), São Sebastião, SP.....	19
Tabela 7: Concentração letal CL50 48h do petróleo bruto para <i>D. similis</i> formas jovens e adultas.....	31
Tabela 8: Valores de pH analisados no início e final dos testes de toxicidade com petróleo.....	31
Tabela 9: Concentração letal CL50 48h da água de produção para <i>D. similis</i> formas jovens e adultas.....	33
Tabela 10: Valores de pH analisados no início e final dos testes de toxicidade com água de produção.....	33
Tabela 11: Concentração letal CL50 48h do petróleo bruto em diferentes pHs para <i>D. similis</i> formas jovens e adultas	35
Tabela 12: Concentração letal CL50 48h da água de produção em diferentes pHs para <i>D. similis</i> formas jovens e adultas	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Comparação dos efeitos letais e sub-letais dos hidrocarbonetos de petróleo sobre peixes e invertebrados (CAPUZZO, 1987).....	13
Figura 2: Processos físico-químicos do óleo no mar. <i>Fonte:</i> CETESB, 2013.....	15
Figura 3: Teia alimentar aquática. <i>Fonte:</i> ANDRÉA, 2008.	20
Figura 4: Esquema da anatomia de <i>Daphnia</i> . <i>Fonte:</i> Adaptado de: http://www.asturnatura.com/articulos/artropodos/branquio.php	23
Figura 5: A - <i>Daphnia similis</i> com efípio. B - Efípio.	24
Figura 6: Ciclo de vida de <i>Daphnia similis</i>	24
Figura 7: Ribeirão Claro, local de coleta da água de manutenção dos organismos. (A) vista da represa de captação de água do rio para a ETA I (ao fundo à direita); (B) vista lateral da represa de água do Ribeirão Claro, SP.	26
Figura 8: A – Aeração da água de criação dos organismos. B – Filtragem para retirada de materiais em suspensão na água.	27
Figura 9: A – Petróleo bruto utilizado no experimento. B – concentrações de petróleo bruto diluído.	28
Figura 10: Água de produção de petróleo.	29
Figura 11: Mortalidade de <i>D. similis</i> no petróleo bruto frente a diferentes pHs.....	37
Figura 12: Mortalidade de <i>D.similis</i> em água de produção de petróleo frente a diferentes pHs.	37

Sumário

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1. Impactos do petróleo no ambiente	11
2.2. Composição química do petróleo	14
2.3. Água de Produção	16
2.4. Bioindicadores	20
2.5. Ecotoxicologia	21
2.6. <i>Daphnia similis</i>	23
3. OBJETIVO.....	25
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1. Organismo-teste.....	26
4.2. Testes de Toxicidade com Petróleo Bruto	27
4.3. Testes de Toxicidade com água de produção	28
4.4 Testes com parâmetros físico-químicos.....	29
4.5 Análise estatística	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1. Testes de Toxicidade com Petróleo Bruto	31
5.2 Testes de toxicidade com água de produção	32
5.3 Testes com parâmetros físico-químicos.....	35
6. CONCLUSÃO	39
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1. INTRODUÇÃO

O progresso tecnológico observado nos últimos anos tem ocasionado um aumento na quantidade e variedade de produtos químicos produzidos pelas indústrias. Além disso, o alto índice populacional concentrado principalmente nas regiões costeiras e a grande produção agrícola tem aumentado os lançamentos desses produtos químicos nos ecossistemas, principalmente o aquático.

Os contaminantes lançados nos corpos d'águas podem ser tanto orgânicos como inorgânicos. Dentre as fontes de contaminação orgânicas, a indústria petrolífera é reconhecida como uma das atividades econômicas com maior potencial de impacto ao meio ambiente devido a grande demanda por fonte de energia relacionada à efetiva participação do petróleo na matriz energética mundial.

O petróleo bruto e seus derivados podem causar diversos impactos sobre a fauna e a flora, desde recobrimento dos organismos, alterações das propriedades físico-químicas dos ambientes contaminados até efeitos tóxicos. Os efeitos biológicos deste contaminante estão relacionados com a forma que o petróleo está disponível e a sua persistência no ambiente como também com o metabolismo do organismo contaminado, ou seja, a capacidade de bioacumular os componentes do petróleo e como estes influenciam a sobrevivência e reprodução dos indivíduos.

Outra fonte poluidora proveniente da indústria do petróleo é a água de produção (água que se separa do óleo durante o armazenamento). Este efluente industrial é composto por diversos produtos químicos tóxicos para a biota aquática, portanto é necessário que ocorra um tratamento antes de ser lançado nos corpos d'água.

Tendo em vista essa problemática ambiental tem crescido a preocupação com a qualidade e disponibilidade da água tanto para o consumo humano como também para manutenção dos ecossistemas aquáticos. Uma das formas encontradas para avaliar o grau de contaminação dos ambientes e que cada vez mais tem sido usado pelos órgãos ambientais são os ensaios ecotoxicológicos com organismos da coluna d'água de ambientes de água doce, estuarinos e marinhos, para avaliar a toxicidade dos produtos químicos presentes no meio hídrico.

Neste contexto, esse trabalho avaliou a toxicidade aguda do petróleo e de seu efluente, água de produção, sobre o microcrustáceo *Daphnia similis* a fim de detectar os possíveis impactos desse poluente na cadeia alimentar aquática, uma vez que estes organismos fazem parte da dieta alimentar de outras espécies.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Impactos do petróleo no ambiente

No Brasil, a principal fonte de energia consumida é o petróleo que é responsável por cerca de 45% do abastecimento no país. Embora o petróleo tenha grande importância não apenas como fonte de energia, mas também como matéria-prima para muitos materiais, as atividades envolvidas desde a sua extração, refino e transporte podem causar muitos danos aos ecossistemas, principalmente no aquático (PINTO *et al.*, 2012).

A contaminação do ambiente aquático pelo petróleo ocorre principalmente pelas águas de lavagem dos tanques dos petroleiros, águas de lastro de navios petroleiros, despejos das refinarias, operação dos petroleiros nos terminais, acidentes envolvendo navios petroleiros e outros tipos de navios e acidentes com oleodutos (ZIOILLI, 2002).

Segundo dados da International Tanker Owners Pollution Federation Limited (ITOPF, 2012), cerca de 5.750.000 de toneladas de petróleo foram lançados no mar durante o período de 1970 a 2012. Porém o número de acidentes envolvendo grande quantidade de petróleo (> 700 toneladas) tem diminuído nos últimos quarenta e três anos, sendo que 55% dos grandes acidentes ocorreram na década de 1970. Em 2012 a quantidade de óleo derramada tem sido a menor já registrada com apenas sete derrames de média proporção.

O acidente do navio Torrey Canyon, em 1967, com 123.000 toneladas derramadas na costa da Bretanha (Reino Unido) que causou a mortalidade de aves e prejuízos à pesca e ao turismo, provocou a formação de diversas convenções internacionais a respeito da segurança do transporte de petróleo via marítima com o objetivo de prevenir os acidentes como também providenciar recursos financeiros para indenizar os prejuízos gerados (POFFO, 2000). A Tabela 1 exemplifica os vinte principais acidentes ocorridos desde 1967.

No Brasil, o primeiro grande vazamento ocorreu com o navio Takimya Maru em 1974, no Canal de São Sebastião, Litoral Norte de São Paulo, na qual foram derramado 6.000 toneladas de óleo. Porém o primeiro caso registrado oficialmente foi o do Brazilian Marina em 1978, ocorrido no mesmo local com mesmo volume derramado (POFFO, 2000). Outros acidentes de grandes proporções envolvendo rompimento de dutos ocorreram no ano de 2000, um na Baía de Guanabara com o vazamento de 1.300 m³ de óleo que contaminou diversos ecossistemas provocando impactos ambientais e econômicos na região e outro ocorrido em

uma refinaria localizada no Paraná vazando 4.000 m³ de óleo cru que acabou alcançando os rios Barigui e Iguçu (TEIXEIRA; MEDRONHO, 2007).

Tabela 1: Principais acidentes na área petrolífera ocorridos no mundo desde 1967

Posição	Navio	Ano	Localização	Volume (ton.)
1	ATLANTIC EMPRESS	1979	Off Tobago, West Indies	287,000
2	ABT SUMMER	1991	700 nautical miles off Angola	260,000
3	CASTILLO DE BELLVER	1983	Off Saldanha Bay, South Africa	252,000
4	AMOCO CADIZ	1978	Off Brittany, France	223,000
5	HAVEN	1991	Genoa, Italy	144,000
6	ODYSSEY	1988	700 nautical miles off Nova Scotia, Canada	132,000
7	TORREY CANYON	1967	Scilly Isles, UK	119,000
8	SEA STAR	1972	Gulf of Oman	115,000
9	IRENES SERENADE	1980	Navarino Bay, Greece	100,000
10	URQUIOLA	1976	La Coruna, Spain	100,000
11	HAWAIIAN PATRIOT	1977	300 nautical miles off Honolulu	95,000
12	INDEPENDENTA	1979	Bosphorus, Turkey	95,000
13	JAKOB MAERSK	1975	Oporto, Portugal	88,000
14	BRAER	1993	Shetland Islands, UK	85,000
15	KHARK 5	1989	120 nautical miles off Atlantic coast of Morocco	80,000
16	AEGEAN SEA	1992	La Coruna, Spain	74,000
17	SEA EMPRESS	1996	Milford Haven, UK 72,000	72,000
18	NOVA	1985	Off Kharg Island, Gulf of Iran	70,000
19	KATINA P	1992	Off Maputo, Mozambique	66,700
20	PRESTIGE	2002	Off Galicia, Spain	63,000
35	EXXON VALDEZ	1989	Prince William Sound, Alaska, USA	37,000
131	HEBEI SPIRIT	2007	Taeon, Republic of Korea	11,000

Fonte: ITOPF 2012.

Os efeitos do óleo sobre os organismos aquáticos podem ser influenciados pelo estágio de vida do organismo, normalmente ovos, larvas e formas juvenis são mais sensíveis que os organismos adultos. As concentrações sub-letais do petróleo podem provocar alterações fisiológicas e comportamentais como também desenvolvimento anormal dos organismos e morte prematura (CARAPETO, 1999). Diversos organismos apresentam respostas toxicológicas diferentes dependendo da quantidade de óleo no qual foi exposto, porém em quantidades pequenas já é possível verificar efeitos sub-letais e até letais (Figura 1).

Muitos estudos foram realizados com diferentes espécies a fim de avaliar a sensibilidade e tolerância de organismos. Bivalves acumulam altos teores de contaminantes (OROS; ROSS,

2005); truta *Salmo gairdneri* exposta à fração solúvel de óleo apresentou danos nas lamelas respiratórias branquiais (ENGELHARDT *et al.*, 1981); crustáceos e peixes também apresentaram sensibilidade a frações solúveis de petróleo (ANDERSON *et al.*, 1974; TATEM *et al.*, 1978; BARRON *et al.*, 1999); a exposição do fitoplâncton ao petróleo e derivados apresentou inibição do crescimento (HSIAO *et al.*, 1978; VERA *et al.*, 2009). Além da toxicidade causada sobre os animais, o petróleo bruto também apresenta efeitos adversos sobre o rebrotamento, crescimento e estrutura de plantas em solos contaminados com petróleo. Estes efeitos foram observados para a macrófita aquática *Echinochloa polystachya* no qual houve diminuição da biomassa, comprimento da folha, número de folhas, número de brotos e aumento de folhas com comprometimento fitossanitário; conforme aumentou-se a dose e o tempo de exposição ao petróleo cru (LOPES; PIEDADE, 2009). Também foram observados efeitos sobre a estrutura anatômica e estado nutricional do lenho das plantas *Campomanesia xanthocarpa* e *Sebastiania commersoniana* no qual houve aumento do diâmetro dos vasos e diminuição do número de vasos e maior teor de manganês e ferro nas plantas das áreas contaminadas (RODRIGUES, 2005); e para o pinheiro-bravo *Podocarpus lambertii* houve aumento da densidade e espessura dos tecidos foliares e diminuição da superfície foliar (MARANHO *et al.*, 2006).

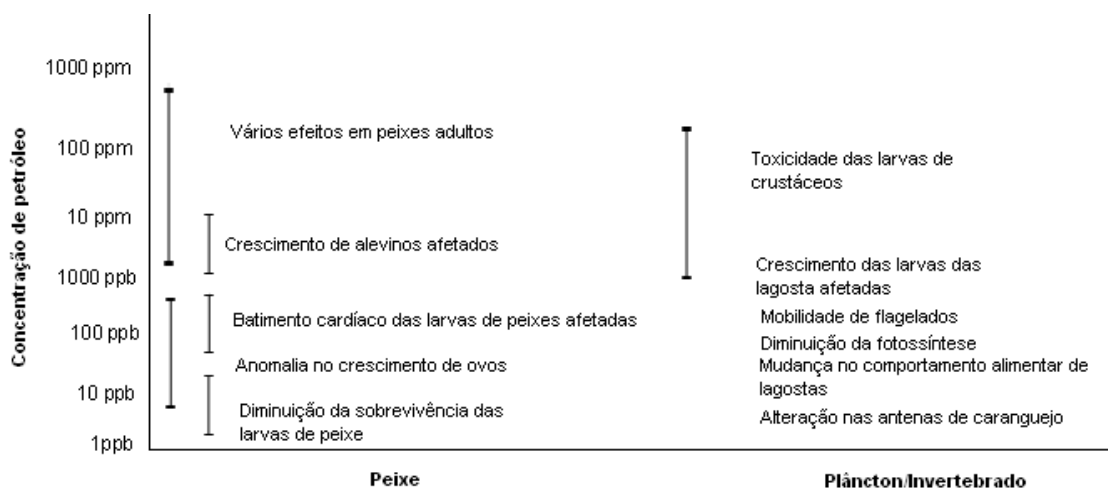


Figura 1: Comparação dos efeitos letais e sub-letais dos hidrocarbonetos de petróleo sobre peixes e invertebrados (CAPUZZO, 1987).

O grau de impacto causado no ambiente vai depender do tipo de acidente (encalhe, naufrágio, falha durante operações carga/descarga e abastecimento em terminais e áreas portuárias), local onde ocorreu (longe da costa ou em áreas abrigadas como baías, enseadas), dimensão do volume vazado e contenção, características do produto vazado e sua toxicidade à

vida aquática, características do óleo, magnitude de áreas afetadas e grau de sensibilidade dos ecossistemas atingidos (CETESB, 2013).

2.2. Composição química do petróleo

O petróleo é composto por uma mistura de hidrocarbonetos formados por átomos de carbono e hidrogênio, e também por pequenas quantidades de enxofre, nitrogênio e oxigênio em proporções variáveis (KOLESNIKOVAS *et al*, 2009). A composição dos demais elementos químicos pode ser visto na Tabela 2.

Tabela 2: Composição elementar do petróleo

Elemento	Concentração Percentual (%)
Carbono	81 a 88
Hidrogênio	10 a 14
Oxigênio	0,001 a 1,2
Nitrogênio	0,002 a 1,7
Enxofre	0,01 a 5

Fonte: KOLESNIKOVAS *et al* 2009

Os hidrocarbonetos do petróleo agrupam-se em quatro classes diferentes: alcanos, cicloalcanos, aromáticos e alcenos, classificados de acordo com sua massa molecular (CARAPETO, 1999). O petróleo bruto apresenta em média cerca de 30 % de alcanos, 50% de ciclo-alcanos e 15% de aromáticos (UNEP, 1992); os alcenos normalmente estão ausentes ou em pequenas quantidades, sendo mais abundantes em produtos refinados como a gasolina (KOLESNIKOVAS *et al*, 2009). O petróleo bruto também é classificado de acordo com suas propriedades físico-químicas, tais como densidade, grau de API (American Petroleum Institute) que consiste em uma escala que mede a densidade dos fluidos derivados do petróleo, composição, meia vida e persistência no ambiente (Tabela 3) e massa molecular (Tabela 4).

Tabela 3: Classificação dos tipos de óleo

Grupo	Densidade	API	Composição	Meia vida	Persistência
I	< 0,8	> 45	Leve	~24h	1 – 2 dias
II	0,80 a 0,85	35 a 45	Leve	~48h	3 – 4 dias
III	0,85 a 0,95	17,5 a 45	Pesado	~72h	5 – 7 dias
IV	> 0,95	< 17,5	Pesado	~168h	> – 7 dias

Fonte: ITOPF

Tabela 4: Classificação dos hidrocarbonetos de acordo com sua massa molecular

Composto molecular (peso)		
Baixo	Médio	Alto
C ₁ a C ₁₀	C ₁₁ a C ₂₂	≥ C ₂₃

Fonte: Szewczyk, 2006.

Dentre estes compostos os hidrocarbonetos aromáticos caracterizados por conterem anéis de benzeno em sua estrutura, são considerados os componentes do petróleo bruto que apresentam maior toxicidade aguda e estão associados aos efeitos crônicos e carcinogênicos (API, 1999).

Os processos físico-químicos que o petróleo sofre quando atinge o ambiente aquático como evaporação, dissolução, oxidação, sedimentação e biodegradação (Figura 2), podem modificar a sua composição e toxicidade como também influenciar no destino deste produto e seu impacto no ambiente (PAUKA, 2007).

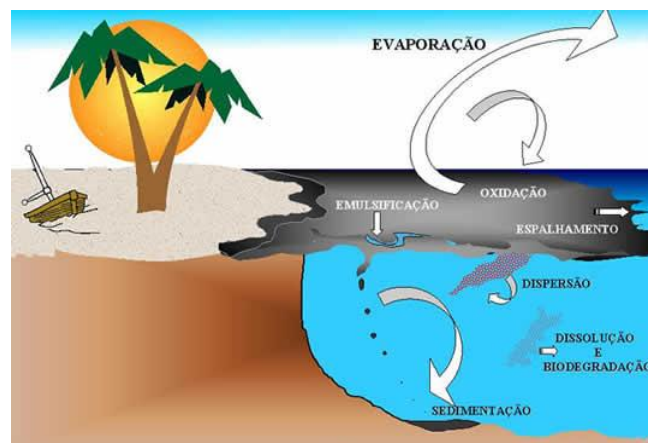


Figura 2: Processos físico-químicos do óleo no mar. Fonte: CETESB, 2013.

Outro aspecto importante é o tempo de exposição dos organismos ao contaminante e a condição do mesmo durante o contato (intemperizado, emulsificado, pelotas, etc). As duas formas principais em que o petróleo provoca impactos nos organismos aquáticos são o efeito físico consequente do recobrimento e o efeito químico, agregado à toxicidade dos compostos presentes (SZEWCZYK, 2006). Portanto o tempo de persistência do óleo no ambiente é muito importante na determinação do impacto que pode aí causar. Segundo a International Tanker Owners Pollution Federation Limited (ITOPF), óleos persistentes são aqueles que possuem uma proporção notável de frações pesadas ou materiais de elevado ponto de ebulição que não dispersam rapidamente. Enquanto que os óleos não-persistentes são normalmente de natureza volátil e são compostos por frações de hidrocarboneto mais leves que são

rapidamente dissipados pela evaporação. A Tabela 5 mostra as categorias de petróleo e seus derivados de acordo com a sua persistência.

Tabela 5: Classificação do petróleo de acordo com a persistência no ambiente

Categoria	Persistência	Exemplos
Grupo I	Não-persistente	Gasolina
Grupo II	Persistente	Diesel, óleo cru leve
Grupo III	Persistente	Óleo cru médio
Grupo IV	Persistente	Óleo cru pesado, residual
Grupo V	Persistente	Produtos com baixo grau API

Fonte: Adaptado de API (American Petroleum Institute) 1999.

2.3. Água de Produção

A produção de óleo e derivados gera grande quantidade de resíduos como a água de produção. Segundo dados da International Association of Oil and Gas Producers (OGP) cerca de 17 milhões de m³ de água de produção são gerados diariamente em operações *offshore* em todo o mundo, juntamente com 120 milhões de barris de óleo equivalente; sendo que 40% desta água produzida (7 milhões de m³) é descartada no mar. No Brasil o Terminal Petrolífero Almirante Barroso (TEBAR) conta com projeto de tratamento desta água de produção.

A água de produção deriva da formação geológica que acumula o petróleo, na qual ela permanece parcialmente misturada ao óleo. Nos primeiros estágios de desenvolvimento do campo de produção, o volume de água produzida é pequeno, porém com a decorrente entrada de água externa do reservatório ou a água que é injetada para aumentar a taxa de recuperação do petróleo, faz com que ao longo do tempo a água de produção aumente até o ponto que se torne inviável a exploração econômica do campo produtor de petróleo (STROMGREN *et al.*, 1995).

Durante o processo de produção de petróleo e gás em alto mar, a água produzida depois que passa pela separação do óleo é lançada em regiões próximas a plataforma ou são reinjetadas novamente para manutenção da pressão nos poços de petróleo (GABARDO, 2007). Esse processo é conhecido como recuperação secundária do petróleo resultando no acúmulo de grande volume de água (GUERRA, 2009). Embora muitos tratamentos sejam

empregados com a finalidade de retirar o óleo da água podem permanecer quantidades de óleos residuais dissolvidos ou como micro-gotas (emulsão) dispersas (VEIL *et al.*, 2004).

A produção de petróleo no Brasil ocorre principalmente no mar (cerca de 80%), sendo a Bacia de Campos a principal produtora. Muitas das plataformas marítimas brasileiras estão localizadas na região norte e nordeste do país principalmente nos estados do Rio Grande do Norte, Ceará, Sergipe e Alagoas, porém muitas são plataformas antigas (MMA, 2006). O descarte de água produzida no Brasil pelas plataformas *offshore* é inferior a 50% das instalações em operação, pois muitas das plataformas que não possuem tratamento do óleo mandam esse óleo juntamente com a água para as unidades que possuem tratamento ou enviam a água produzida para tratamento em terra (GABARDO, 2007). No estado de Sergipe, a produção de óleo gera aproximadamente 40.000 m³ de água produzida por dia que contém cerca de 1000 mg/L de óleos e graxas (GOMES, 2009). Em 1998, um volume estimado de 9,3 milhões de m³ de água de produção foi descartado no mar pelas sete plataformas fixas da Bacia de Campos (VEGUERIA *et al.*, 2002).

A legislação sobre o descarte da água produzida no mar varia mundialmente. Na Austrália os valores de óleos e graxas são em média diária de 30 ppm com no máximo 50 ppm, enquanto que no Mediterrâneo, Golfo Pérsico e Ásia os valores são de 40 ppm (MMA, 2006). No Brasil, no caso das plataformas marítimas de petróleo a Resolução 393/2007 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) estabelece uma concentração média aritmética mensal de óleos e graxas de até 29 mg/L, com valor máximo diário de 42 mg/L. Por outro lado, o descarte nos corpos receptores segundo a Resolução 357/2005 do CONAMA o limite é de até 20 mg/L de óleos e graxas.

A composição química da água de produção varia conforme as características do reservatório de óleo apresentando diversos poluentes como visto na Tabela 6. Em relação aos hidrocarbonetos presentes na água produzida encontra-se: alcenos; alcinos; hidrocarbonetos aromáticos voláteis como: benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX); hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs) como: naftaleno, fenantreno e dibenzotiofeno e hidrocarbonetos complexos, com oxigênio, nitrogênio e enxofre (GUERRA, 2009). Os constituintes orgânicos da água de produção podem se apresentar tanto na forma dispersa como dissolvida, conforme a solubilidade de cada composto (OGP, 2005).

Durante o processo de produção são adicionados diversos produtos químicos que incorporam a composição da água produzida. Estes produtos são normalmente denominados aditivos e tem a finalidade de resolver ou prevenir problemas operacionais. Como cada campo produtor possui um sistema único utilizam de forma diferenciada estes aditivos, formando

portanto efluentes com características físico-químicas diferentes. Os aditivos que são acrescentados no processo de produção são geralmente inibidores de incrustação, inibidores de corrosão, biocidas, desemulsificantes, aditivos para o tratamento da água (coagulantes e floculantes), inibidores de deposição de parafinas/asfaltenos e antiespumantes (OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2000).

Os impactos ambientais gerados pelo descarte da água de produção são usualmente avaliados pela toxicidade de seus constituintes e pela quantidade de compostos orgânicos e inorgânicos presentes. Depois do descarte, parte destes poluentes mantém-se dissolvidos, enquanto que outros acabam saindo da solução (OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2000). Estudos realizados com espécies diversas mostraram o potencial tóxico da água produzida sobre os organismos como o caso da exposição do mexilhão *Mytilus edulis* na qual foi observado a biocumulação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos nas doses mais baixas (DURELL, *et al.*, 2006; SUNDT *et al.*, 2011). Também foram observados efeitos sub-letais em espécies diferentes de peixes (STEPHENS *et al.*, 2000; HOLTH *et al.*, 2011). A diatomácea *Skeletonema costatum*, o copépodo *Acartia tonsa* e o misidáceo *Mysidopsis juniae* também mostraram-se sensíveis aos componentes da água de produção (IHARA, 2008).

Tabela 6: Caracterização da água de produção do Terminal Marítimo Almirante Barroso (TEBAR), São Sebastião, SP.

Parâmetro	Valores	
	Mínimo	Máximo
pH	7,46	7,92
Salinidade (g NaCl/L)	35,00	45,00
Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}^2$)	43300,00	524000,00
DBO (mg/L)	208,00	314,00
Alcalinidade (mg/L)	1432,00	2356,00
Amônia (mg N-NH ₃ /L)	161,00	213,00
Cloreto (g/L)	22,00	29,00
TOC (mg/L)	125,00	146,00
Fenol (mg/L)	2,00	3,70
Fósforo (mg P-PO ₄ ⁻³ /L)	0,30	0,70
Sulfato (mg/L)	120,00	235,00
Sulfeto (mg/L)	95,00	250,00
Prata (mg/L)	< 0,10	< 0,10
Alumínio (mg/L)	< 0,10	< 0,10
Arsênio (mg/L)	< 0,10	< 0,10
Boro (mg/L)	13,00	22,00
Bário (mg/L)	7,00	18,00
Cálcio (mg/L)	862,00	1780,00
Cádmio (mg/L)	< 0,10	< 0,10
Cromo (mg/L)	< 0,10	< 0,10
Cobre (mg/L)	< 0,10	0,13
Ferro (mg/L)	0,70	0,80
Mercúrio ($\mu\text{g}/\text{L}$)	< 2,00	< 2,00
Potássio (mg/L)	231,00	310,00
Magnésio (mg/L)	571,00	832,00
Manganês (mg/L)	0,50	1,10
Sódio (mg/L)	11360,00	19240,00
Níquel (mg/L)	< 0,10	< 0,10
Chumbo (mg/L)	< 0,10	< 0,10
Antimônio (mg/L)	< 0,10	< 0,10
Estanho (mg/L)	< 0,10	< 0,10
Estrôncio (mg/L)	78,00	135,00
Vanádio (mg/L)	< 0,10	< 0,10
Zinco (mg/L)	< 0,10	< 0,10

Fonte: R. Suhett de Souza (CENPES, 2013, comunicação pessoal).

2.4. Bioindicadores

Os bioindicadores são espécies, grupos de espécies ou comunidades biológicas cuja presença, quantidade e distribuição indicam a magnitude de impactos ambientais em um ecossistema aquático e sua bacia de drenagem (CALLISTO; GONÇALVES, 2002). Além disso, sua utilização reflete a integridade ecológica total dos ecossistemas (integridade física, química e biológica), integrando os efeitos dos diferentes agentes impactantes e fornecendo medida agregada dos danos (GOULART; CALLISTO, 2003).

Dessa forma o biomonitoramento de rios age como uma ferramenta de vigilância, isto é, uma metodologia para acompanhar as condições dos ecossistemas aquáticos com a finalidade principal de detectar impactos acidentais ou decorrentes de atividades produtivas. Este monitoramento ambiental também pode atuar como uma medida reguladora, sendo utilizado como uma prova contra ações criminosas causadoras de danos ambientais (SILVEIRA, 2004).

As espécies bioindicadoras devem possuir uma relevância biológica para informar sobre a possível contaminação do ecossistema estudado. Dentre os elementos que caracterizam esta relevância, um dos mais importantes é a sua posição trófica, pois quanto menor for seu nível trófico, ou seja, quanto mais servir de alimento para os níveis superiores da cadeia trófica, maior é sua relevância biológica como bioindicador, pois pela sua contaminação toda a cadeia trófica pode se contaminar. Além de que, organismos de base de cadeia alimentar possivelmente fazem parte de várias teias ou redes alimentares (Figura 3), e com isso as medidas de contaminação em organismos bioindicadores destes níveis tróficos podem indicar o perigo potencial de contaminação de várias teias alimentares (ANDRÉA, 2008).

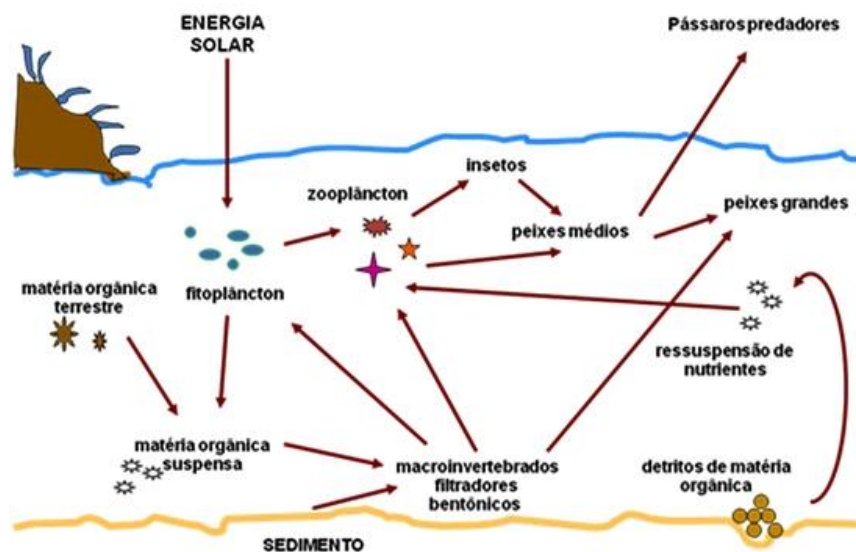


Figura 3: Teia alimentar aquática. Fonte: ANDRÉA, 2008.

O biomonitoramento de um ecossistema lacustre ou marinho pode ser realizado com diversos grupos de organismos como peixes, macroinvertebrados, algas e bactérias. Dentre estes, os organismos da comunidade zooplanctônica possuem um grande potencial indicador. Os principais representantes dos ambientes de água doce do zooplâncton são os cladóceros e copépodes (microcrustáceos), rotíferos e os protozoários testáceos (SOUZA, 2012). O biomonitoramento realizado com este grupo de organismos constitui uma ferramenta importante de estudo, tendo em vista que estes organismos estão associados às condições químicas, físicas e biológicas do sistema, possuindo “papel central na dinâmica de um ecossistema aquático, especialmente na ciclagem de nutrientes e no fluxo de energia” (ESTEVEES, 1998 *apud* SOUZA, 2012).

2.5. Ecotoxicologia

A ecotoxicologia é uma área especializada da toxicologia ambiental que estuda os efeitos causados por agentes químicos e físicos sobre a dinâmica de populações e comunidades. Este seguimento de ciência é importante na determinação dos níveis de poluentes no ambiente; na estimativa do grau de risco dos contaminantes e seus metabólitos para os organismos vivos; na determinação de padrões de lançamentos de poluentes que necessitam ser mantidos; no diagnóstico dos efeitos dos contaminantes no ambiente e o efeito das medidas que são tomadas; no controle da emissão de efluentes e na avaliação dos riscos ecológicos (COSTA *et al.* 2008).

A utilização de testes ecotoxicológicos agrega os conceitos de Ecologia no sentido da diversidade e representatividade dos organismos e seu significado ecológico nos ecossistemas e da Toxicologia com os efeitos adversos dos contaminantes sobre as comunidades biológicas (PLAA, 1982 *apud* ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Os testes ecotoxicológicos para o monitoramento da qualidade da água têm sido amplamente utilizados nos últimos anos, pois tem-se conhecimento que somente através das análises químicas não há como elaborar diagnósticos sobre os impactos ambientais ocasionados pelos contaminantes. A utilização isolada das análises físico-químicas não detectam os efeitos causados nos organismos, não informam que tipo de agente químico é responsável pela toxicidade e também se ocorrem interações entre estes agentes (aditivas, antagônicas ou sinérgicas) e sobre sua biodisponibilidade (MAGALHÃES; FILHO, 2008).

A avaliação dos efeitos de contaminantes nos ecossistemas como um todo é complexa e muitas vezes impraticável, pois demanda custos, disponibilidade de tempo, dificuldades com a extensão das áreas impactadas e da diversidade das espécies envolvidas. Para poder medir os efeitos deletérios de substâncias tóxicas sobre o meio ambiente que muitas vezes requerem respostas rápidas, os testes toxicológicos agudos auxiliam na estimativa das concentrações que um determinado agente tóxico ocasiona sobre uma população de organismo selecionada (VIEIRA, 2004).

Os ensaios de toxicidade podem ser divididos em agudos: no qual avaliam os efeitos mais brutos e rápidos causados nos organismos expostos a substância química em um espaço de tempo curto onde considera-se a mortalidade e mobilidade destes organismos, e os testes crônicos onde são avaliados os efeitos adversos mais sutis que não são detectados em testes de toxicidade aguda, como os efeitos sub-letais que podem causar distúrbios fisiológicos ou comportamentais ao longo do tempo (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

As espécies utilizadas nesses testes necessitam possuir as seguintes características: seletividade constante e elevada aos contaminantes, alta disponibilidade e abundância, uniformidade e estabilidade genética nas populações, representatividade de seu nível trófico, significado ambiental em relação à área de estudo, ampla distribuição e importância comercial e facilidade de criação e de adaptação às condições de laboratório. Também devem ser escolhidas espécies cuja fisiologia, genética e comportamento sejam bem conhecidos, facilitando dessa forma a interpretação dos resultados (COSTA *et al.*, 2008).

Neste contexto, os cladoceros como *Daphnia* são ideais para os testes ecotoxicológicos em laboratórios e são amplamente recomendados por órgãos de controle ambiental como a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), devido a características como ampla distribuição nos corpos hídricos superficiais e grande importância na cadeia alimentar aquática, servindo de alimento para larvas e pequenos peixes. Apresentam ciclos de vida curto, são facilmente criados em laboratórios e são sensíveis a agentes químicos (WIECZOREK, 2003).

2.6. *Daphnia similis*

Daphnia similis, conhecida também como pulga d'água, é um microcrustáceo bentônico de água doce pertencente à ordem Cladocera família Daphniidae. São organismos suspensívoros que se alimentam de partículas em suspensão como bactérias, fitoplâncton e detrito. São representantes ecologicamente importantes das comunidades bentônica e planctônica de lagos (RUPPERT *et al.*, 2005). No Brasil são encontradas naturalmente três espécies *Daphnia gessnerii*, *D. ambigua* e *D. levis* (MATSUMURA-TUNDISI, 1984). Sendo que para realização de testes ecotoxicológicos são utilizadas mundialmente as espécies *Daphnia similis* e *D. magna* pois são muito sensíveis a agentes químicos e são facilmente criadas em laboratório (FREAR; BOYD, 1967 *apud* ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Estes organismos possuem cerca de 0,5 a 5,0 mm de comprimento (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006) e possuem uma carapaça que serve como câmara incubadora dorsal, dois pares de apêndices sensoriais: uma primeira antena pequena com pelos sensitivos, e uma segunda antena maior que é a principal estrutura de locomoção, que se dá mediante a promoção de “saltos” (RUPPERT *et al.*, 2005). A alimentação é realizada mediante a movimentação das cerdas que agem como peneiras na retenção de algas e partículas do material orgânico presente na água. O alimento é transferido para boca na qual é triturado pelas mandíbulas e enviados para o trato digestivo, cuja retenção do alimento varia de meia a três horas (BUIKEMA; SHERBERGER, 1977 *apud* ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

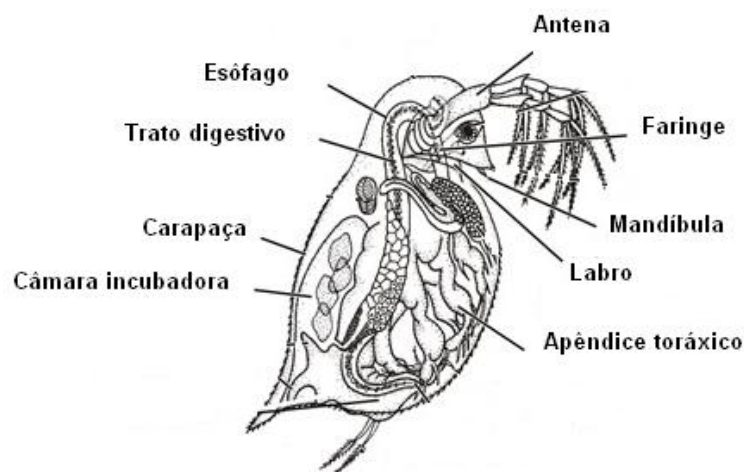


Figura 4: Esquema da anatomia de *Daphnia*. Fonte: Adaptado de: <http://www.asturnatura.com/articulos/artropodos/branquio.php>

O ciclo de vida de *D. similis*, como em todos os cladoceros, consiste em fases alternadas de partenogênese (Figura 6). Neste tipo de reprodução, a população é composta apenas por fêmeas, o desenvolvimento é direto e ocorre na câmara incubadora dorsal. Quando o jovem deixa a câmara, a fêmea sofre ecdise e uma nova desova é liberada na nova câmara incubadora. A presença de indivíduos machos está ligada a alguns fatores ambientais, como mudanças na temperatura, falta de alimento e super população. Com os machos presentes na população ocorre reprodução sexuada e as fêmeas começam a produzir ovos de resistência, estes são liberados e armazenados em uma cápsula quitinosa protetora denominada efípio. Esses ovos resistem à dessecação e congelamento, tornando-se uma forma de dispersão dos cladoceros (RUPPERT *et al.*, 2005).

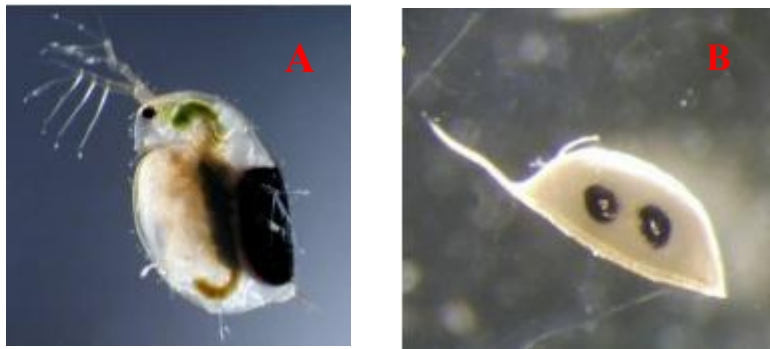


Figura 5: A - *Daphnia similis* com efípio. B - Efípio.

Fonte: <http://www.peamb.eng.uerj.br/trabalhosconclusao/2010/SarahDarioAlves.pdf>

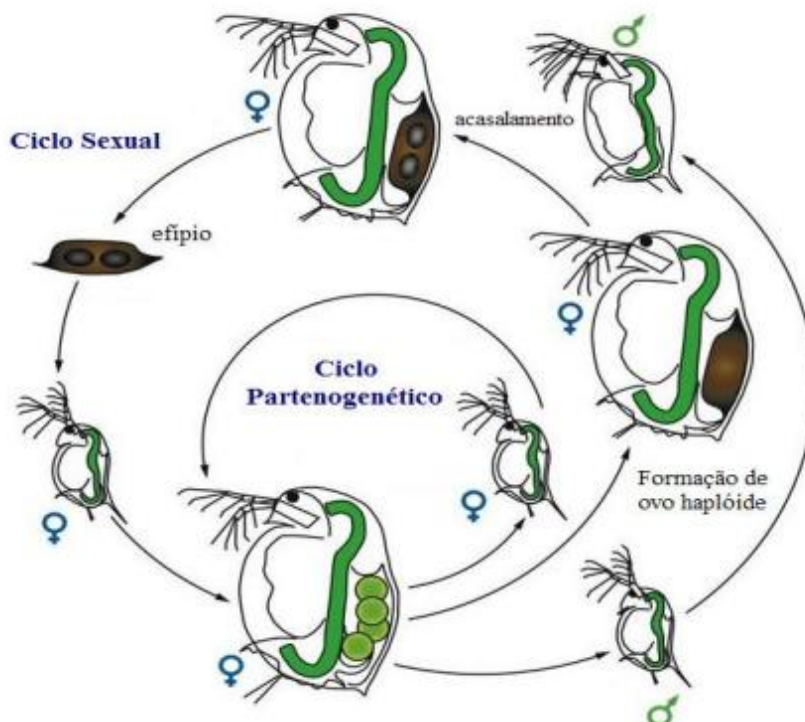


Figura 6: Ciclo de vida de *Daphnia similis*.

Fonte: Adaptado de: <http://www.evolution.unibas.ch/ebert/publications/parasitismdaphnia/ch2f9.htm>

3. OBJETIVO

Avaliar a toxicidade aguda do petróleo bruto sobre *Daphnia similis* em diferentes condições físico-químicas da água de rios e água de produção, objetivando fornecer subsídios em caso de acidentes em que ocorra sua dispersão.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Organismo-teste

Os indivíduos de *D. similis* utilizados no experimento foram obtidos a partir de culturas mantidas no Laboratório de Ensino e Pesquisa de Toxicidade de Águas do Departamento de Bioquímica e Microbiologia da UNESP campus de Rio Claro segundo adaptações das normas técnicas da ABNT NBR 12713:2009 e CETESB L5. 022, 1991. Foram mantidos em béqueres de 1L em incubadora BOD, com temperatura controlada de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, iluminação de 1000 Lux e fotoperíodo 16 horas de luminosidade e 8 horas de escuro. A alimentação foi realizada diariamente com 2 mL de suspensão da alga *Pseudokirchneriella subcapitata* na concentração de $3,0$ a $3,5 \times 10^7$ mL (determinada mediante a contagem em câmara de Neubauer) e 1 mL de ração (ração para peixes + fermento).

A renovação da água de manutenção foi realizada duas vezes por semana. Esta água foi coletada quinzenalmente no rio Ribeirão Claro, junto à captação da Estação de Tratamento de Água (ETA I) do Departamento Autônomo de Água e Esgoto (DAAE) do município de Rio Claro, SP (Figura 7).



Figura 7: Ribeirão Claro, local de coleta da água de manutenção dos organismos. (A) vista da represa de captação de água do rio para a ETA I (ao fundo à direita); (B) vista lateral da represa de água do Ribeirão Claro, SP.

A coleta é realizada neste local pois as características da água garantem maior adaptabilidade dos organismos-teste; trata-se de água de um rio de Classe II e que não recebe contaminantes associados à área urbana ou industrial.

No entanto, de acordo com as normas para melhorar as condições de sobrevivência dos organismos, o pH foi ajustado a faixa de 7.2 a 7.6, com adição de ácido clorídrico 1M e a

dureza foi ajustada na faixa de 40mg/L a 48mg/L em CaCO_3 , com adição de soluções aquosas de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; KCl ; NaHCO_3 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Depois dos ajustes físico-químicos de pH e dureza, a água de manutenção dos microcrustáceos foi mantida sob aeração para ser enriquecida em oxigênio até a saturação e adquirir estabilidade. Após a aeração a água foi filtrada em peneira e algodão para retirada de partículas em suspensão que pudessem interferir na manutenção dos organismos (Figura 8).

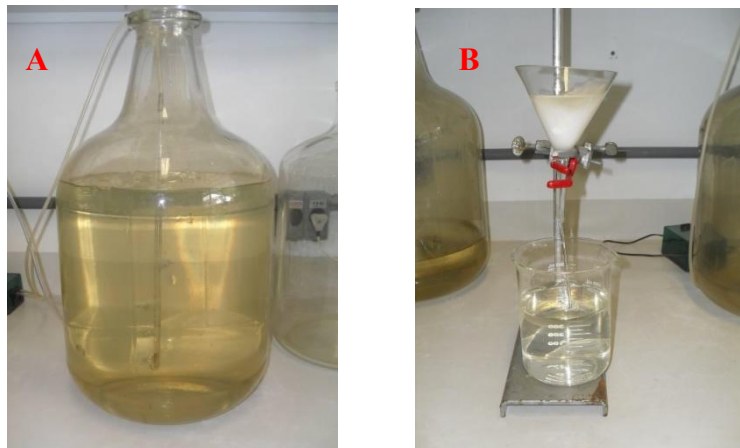


Figura 8: **A** – Aeração da água de criação dos organismos. **B** – Filtragem para retirada de materiais em suspensão na água.

A cada 2 a 3 semanas, as *Daphnias* mães (matrizes) eram renovadas, colocando-as em novos recipientes. Os filhotes de até 24 horas eram retirados e transferidos a um novo béquer, dando início a uma nova criação.

Os neonatos utilizados nos testes de toxicidade foram separados no dia da realização do teste e as fêmeas adultas separadas dois dias antes, ambos eram colocados em béqueres de 200 mL.

4.2. Testes de Toxicidade com Petróleo Bruto

O petróleo bruto utilizado foi fornecido pela Refinaria de Petróleo de Paulínia (REPLAN).

Os testes de toxicidade foram divididos em preliminar e definitivo. O teste preliminar objetivou estimar a faixa de concentração mais provável para a ocorrência de efeito agudo. Determinada esta faixa, os testes definitivos foram realizados com uma série de concentrações, sendo realizadas cinco repetições de cada teste.

Cada concentração avaliada foi preparada de forma individual, ou seja, sem ocorrer diluição a partir de uma solução-estoque. As concentrações avaliadas foram na faixa de 2 a

1000 mg/L de petróleo bruto, sendo que as concentrações dos testes definitivos foram de 2; 3; 4; 5; 6; 7 e 8 mg/L. As soluções foram preparadas em balão volumétrico de 1L, no dia em que eram realizados os testes.

A água de diluição utilizada para o preparo das soluções foi a própria água de cultivo dos organismos coletada no Ribeirão Claro. Para cada concentração avaliada, foram utilizados béqueres de 500 mL contendo a solução-teste (Figura 9). Foram inseridos cinco organismos em cada recipiente-teste, com quatro réplicas de cada concentração. Os testes foram realizados com neonatos de até 24 horas de vida e fêmeas adultas de até dois dias de vida de *Daphnia similis* para observar se ocorria a formação de efípios. Também foram feitas uma solução controle utilizando água do Ribeirão Claro. O experimento foi mantido em Câmara de Incubação BOD com temperatura controlada de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ no escuro, sem alimentação. O teste foi realizado durante o período de 48 horas. Após esse tempo, foi verificada a toxicidade das soluções em termo de sobrevivência dos organismos. Paralelamente aos testes de toxicidade foi realizada análise físico-química das amostras para caracterização de potencial hidrogeniônico (pH) utilizando uma réplica de cada concentração no início e final de cada teste.

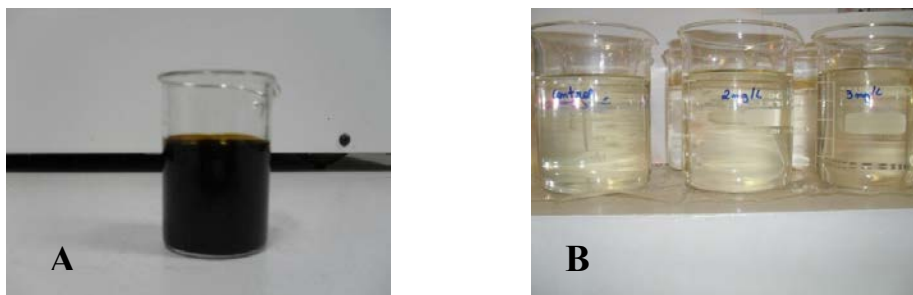


Figura 9: **A** – Petróleo bruto utilizado no experimento. **B** – concentrações de petróleo bruto diluído.

4.3. Testes de Toxicidade com água de produção de petróleo

A água de produção utilizada foi fornecida pelo Terminal Marítimo Almirante Barroso do município de São Sebastião, SP (Figura 10).

As concentrações avaliadas foram na faixa de 0,2; 0,5; 0,8; 1; 3; 5; 6; 7; 8; 9 e 10% de água produzida. A água de diluição foi a mesma utilizada no cultivo dos microcrustáceos. As soluções foram preparadas em balão volumétrico de 1L no dia da realização dos testes. A água de produção foi filtrada em filtro de papel para retirada do material em suspensão que pudesse interferir na sobrevivência dos organismos.

Os testes seguiram a mesma metodologia anterior, sendo colocados cinco neonatos e cinco fêmeas adultas em béqueres de 500 mL, o experimento foi mantido em Câmara de Incubação BOD com temperatura controlada de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ no escuro, durante o período de 48 horas. Após esse tempo, foi verificada a toxicidade das soluções em termo de sobrevivência dos organismos. Paralelamente aos testes de toxicidade foi realizada análise físico-química das amostras para caracterização de potencial hidrogeniônico (pH) utilizando uma réplica de cada concentração no início e final.



Figura 10: Água de produção de petróleo.

4.4 Testes com parâmetros físico-químicos

Foram realizados testes com parâmetros físico-químicos como pH e temperaturas a fim de verificar se estas variáveis ambientais em conjunto com as concentrações de petróleo e água de produção pudessem influenciar na sobrevivência dos microcrustáceos.

Para atender a resolução nº430 de 13 de maio de 2011 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) foram utilizados pHs nas faixas de 5 a 9 e temperaturas entre 15 a 25°C .

Após a realização das diluições de petróleo e da água de produção utilizadas no teste definitivo de toxicidade os pHs foram ajustados na faixa de 5 a 9. A metodologia do teste seguiu conforme a utilizada nos testes de toxicidade, ou seja, foram utilizados a mesma quantidade de organismos, a mesma quantidade de réplicas, o período de exposição foi o mesmo e foram mantidos na incubadora BOD com a mesma temperatura do teste anterior. Também foram realizados testes com soluções controles com a água do Ribeirão Claro com o pH ajustado.

Os testes com temperaturas também seguiram a mesma metodologia dos testes com pH, diferenciando apenas no ajuste das temperaturas (15; 18; 23 e 25°C).

4.5 Análise estatística

A expressão do resultado em todos os testes de toxicidade foi a CL50.

A CL50 é a concentração do agente tóxico que causa efeito agudo que causa mortalidade a 50% dos organismos-teste em um determinado período de exposição. Sempre que um valor de CL50 é fornecido, calculam-se também os limites de 95% de confiança sendo uma medida muito importante, pois definem a variabilidade da população. Os cálculos foram realizados através do Método Trimmed Sperman-Karber (HAMILTON *et al.*, 1997).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Testes de Toxicidade com Petróleo Bruto

Os testes de toxicidade com petróleo bruto foram distribuídos em cinco testes, sendo que a CL50/48h para os neonatos de *Daphnia similis* teve uma faixa de sensibilidade entre 2.75 mg/L e 2.91 mg/L e para as fêmeas adultas em média apresentou faixa de sensibilidade de 2.91 mg/L a 3.05 mg/L, não apresentando muita diferença entre as fases de vida dos microcrustáceos (Tabela 7). Verificou-se que a solução controle apresentou 100% de sobrevivência.

Tabela 7: Concentração letal CL50 48h do petróleo bruto para *D. similis* formas jovens e adultas.

Teste	CL50 48h neonato	IC 95%		CL50 48h adulto	IC 95%	
		limite inferior	limite superior		limite inferior	limite superior
1	2.91	1.81	4.68	3.05	1.84	5.04
2	2.75	2.01	3.76	2.91	1.81	4.68
3	2.91	1.81	4.68	3.01	2.14	4.23
4	2.91	1.81	4.68	2.91	1.81	4.68
5	2.75	2.01	3.76	2.91	1.81	4.68
Média	2.85	-	-	2.96	-	-

IC= Intervalo de confiança.

Os valores de pH foram medidos no início e no final dos testes em uma réplica de cada diluição (Tabela 8).

Tabela 8: Valores de pH analisados no início e final dos testes de toxicidade com petróleo

Concentração petróleo bruto (mg/L)	pH	
	início	final
2,0	7.5	7.7
3,0	7.5	7.7
4,0	7.5	7.7
5,0	7.6	7.8
6,0	7.6	7.8
7,0	7.8	8.0
8,0	8.0	8.5

Na concentração de 3mg/L observou-se a mortalidade de 50% dos microcrustáceos nas duas fases de vida, sendo que na concentração de 8mg/L ocorreu a mortalidade de 100% da população nas cinco repetições dos testes.

Os efeitos tóxicos do petróleo sobre os organismos dependem do tempo de exposição e da sensibilidade destes ao contaminante. A CL50/48h obtida nos ensaios ecotoxicológicos para o microcrustáceo *D. similis* foi considerada mais próxima dos resultados encontrados na literatura para outros crustáceos como larvas do caranguejo *Emerita analoga* na qual a CL50/96 horas foi de 1,33 mg/L (MONTES, 2008), porém outros estudos apresentaram valores de CL50 maiores como para o microcrustáceo *Kalliapseudes schubartii* a CL50/10 dias foi de 105740,50 mg/L para fração solúvel do petróleo (Brendolan, 2004). As espécies como o camarão *Penaeus vannamei* e o microcrustáceo *Mysidopsis bahia* apresentaram CL50/ 96h de 30-48% quando expostos a frações solúveis de petróleo (NEFF *et al.*, 2000); para larvas do peixe marinho *Odontesthes argentinensis* a CL50/96h foi de 70,68% a fração solúvel do petróleo (RODRIGUES, 2009).

Embora os microcrustáceos não tenham apresentado grande diferença entre as fases de vida, as fêmeas adultas apresentaram menor sensibilidade que os neonatos, porém em todos os testes realizados não foi verificada a formação de efípio mostrando que o petróleo bruto é muito tóxico ao microcrustáceo impedindo, portanto a sua reprodução.

5.2 Testes de toxicidade com água de produção

Os testes de toxicidade com água de produção foram distribuídos em cinco testes apresentando aparente similaridade entre eles. Os valores da CL50 obtidos para os neonatos de *D. similis* encontraram-se entre 6.57% e 7.42% e para as fêmeas adultas os valores de CL50 48h situaram-se entre 6.83% e 7.42% apresentando pouca diferença entre as fases de vida dos microcrustáceos (Tabela 9). A solução controle apresentou 100% de sobrevivência.

Tabela 9: Concentração letal CL50 48h da água de produção para *D. similis* formas jovens e adultas

TESTES	CL50 48h neonato	IC 95%		CL50 48h adulto	IC 95%	
		Limite inferior	Limite superior		Limite inferior	Limite superior
1	7.42	7.00	7.86	7.42	7.00	7.86
2	6.57	6.15	7.02	6.83	6.29	7.43
3	6.83	6.29	7.43	7.42	7.00	7.86
4	6.83	6.29	7.43	7.23	6.84	7.65
5	6.57	6.15	7.02	6.83	6.29	7.43
Média	6.84	-	-	7.15	-	-

IC: Intervalo de confiança.

Os valores de pH foram medidos no início e no final dos testes em uma réplica de cada diluição, não apresentando muita variação entre o período analisado (Tabela 10).

Tabela 10: Valores de pH analisados no início e final dos testes de toxicidade com água de produção.

Diluições de água de produção (%)	pH	
	início	final
5	7.7	7.4
6	7.8	7.5
7	7.9	7.6
8	8.0	7.7
9	8.1	7.8
10	8.2	7.9

Nas concentrações menores que 5% de água de produção de petróleo não ocorreu mortalidade dos microcrustáceos. Na concentração de 5% a mortalidade foi menor do que 15%, nas concentrações de 7% e 8% foram observados a mortalidade de 50% dos organismos e acima dessas concentrações ocorreram 100% de mortalidade dos indivíduos.

Várias pesquisas foram realizadas com diversos organismos a fim de detectar a toxicidade da água de produção, porém não foi possível encontrar faixas de sensibilidade semelhantes entres os diferentes táxons estudados, pois cada água produzida apresenta características químicas e toxicidade diferentes (NEFF, 2002). Além disso, cada organismo comporta-se de forma distinta aos componentes desse contaminante. Outro fator que também pode interferir na toxicidade da água produzida é o tempo de exposição dos indivíduos ao contaminante.

A literatura não apresenta estudos de toxicidade de água de produção para *D. similis*, porém comparando os resultados dessa pesquisa com testes realizados com outros organismos principalmente outros crustáceos, verifica-se que os valores da CL50/48h para a *D. similis* obtidas nesse trabalho está dentro da faixa de resultados encontrados para *Americamysis bahia* cujo os valores de CE50/96h foi de 4,9% a 11,8%; o camarão *Penaeus aztecus* com CL50/96h de 6,0% a 18,3% (STEPHENSON *et al*, 1994 *apud* NEFF, 2002); o copépodo *Acartia tonsa* com CE50/48h variando de 0,6% a 24,8% (FLYNN *et al*, 1996; STAGG *et al*, 1996; IHARA, 2008); No entanto o microcrustáceo *Mysidopsis juniae* apresentou-se mais sensível que a *D. similis* com valores de CE50/96h variando de 0,6% a 8,9% (GABARDO, 2007; IHARA, 2008), e *Artemia salina* foi a espécie que apresentou menor toxicidade para a água de produção com CE50/24h de 16% a 29,12% (STEPHENSON *et al*, 1994 *apud* NEFF, 2002; BARBIERI, 2004).

A água de produção é composta por diferentes elementos químicos que podem apresentar toxicidade para os organismos. No estudo realizado por Gabardo (2007) foi encontrado forte correlação entre os testes de toxicidade com *Mysidopsis juniae* e as concentrações de fenóis e carbono total orgânico (COT). No presente trabalho a concentração de COT da água de produção foi em média igual a 135mg/L, sendo que os valores de COT encontrados nas plataformas brasileiras encontram-se entre 86 e 971 mg.L⁻¹ (GABARDO, 2007). Com relação aos fenóis, a água de produção desta pesquisa apresentou em média 2,8 mg/L de fenol, estudos apontaram que este elemento químico pode interferir na toxicidade aguda da água produzida (FLYNN *et al*, 1996), sendo que os fenóis alquilados são os mais tóxicos (OGP, 2005).

Outros compostos que podem influenciar a toxicidade da água de produção são os cloretos e sulfatos, os valores para a água de produção utilizadas nos testes foram de 26mg/L e 162mg/L respectivamente. Esses componentes em altas concentrações podem ocasionar efeitos tóxicos devido ao desequilíbrio iônico em diferentes organismos (IHARA, 2008). Em relação aos metais presentes na água de produção como geralmente ocorre a precipitação destes ao entrar em contato com a água, normalmente não é atribuída a toxicidade destes nos ensaios toxicológicos da água de produção (STEPHENSON *et al*, 1994 *apud* IHARA, 2008). A amônia presente nesse efluente também pode ocasionar a toxicidade da água de produção, uma vez que dependendo do pH da água esta pode-se encontrar na forma ionizada (NH₄⁺) ou não ionizada (NH₃). Em pHs alcalinos como os apresentados nas concentrações avaliadas nos ensaios e também da água de produção deste estudo, a amônia apresenta-se de forma não ionizada que é altamente toxica para os organismos aquáticos.

Embora os hidrocarbonetos de petróleo como os compostos aromáticos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno) e os HPAs (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) sejam conhecidos por apresentarem toxicidade aos organismos aquáticos, nos ensaios de toxicidade aguda com água de produção estes componentes não apresentaram interferência na toxicidade para a água produzida (FLYNN *et al*, 1996; GABARDO, 2007).

A toxicidade da água produzida não parece estar diretamente associada somente a um único fator, ou seja, provavelmente esteja relacionada a interações entre os diversos constituintes presentes na amostra que concomitantes podem agir de forma sinérgica, aditiva e/ou antagônica sobre a toxicidade da mesma (IHARA, 2008).

5.3 Testes com parâmetros físico-químicos

Os testes realizados com diferentes pHs mostrou variação na CL50/48h em relação aos testes sem alteração do pH. Os pHs ácidos 5 e 6 foram os que mais apresentaram diminuição da toxicidade, principalmente do petróleo bruto. A água de produção não apresentou grande diferença nos valores de CL50 (Tabelas 11 e 12).

Tabela 11: Concentração letal CL50 48h do petróleo bruto em diferentes pHs para *D. similis* formas jovens e adultas

pH	CL50/48h – Petróleo bruto					
	Neonato	IC 95%		Adulto	IC 95%	
		Inferior	Superior		Inferior	Superior
5	4.06	3.43	4.82	3.91	2.92	5.24
6	4.51	3.74	5.46	4.82	3.99	5.82
7	3.18	1.98	5.09	2.45	Não calculado	

IC: Intervalo de confiança.

Tabela 12: Concentração letal CL50 48h da água de produção em diferentes pHs para *D. similis* formas jovens e adultas

pH	CL50/48h - Água de produção					
	Neonato	IC 95%		Adulto	IC 95%	
		Inferior	Superior		Inferior	Superior
5	7.68	7.27	8.12	6.77	6.43	7.13
6	7.2	6.82	7.61	7.47	7.1	7.87
7	6.95	6.58	7.35	6.84	6.43	7.28
8	6.57	6.15	6.57	6.83	6.29	7.43

IC: Intervalo de confiança.

Em relação ao petróleo bruto os pHs 8 e 9 apresentaram 90 e 100% de mortalidade dos microcrustáceos, portanto não foi possível calcular a CL50/48h (Figura 11). Entretanto para a água de produção isso só ocorreu com o pH 9. As soluções controles com pHs ajustados também na faixa de 5 a 9, apresentaram mortalidade dos microcrustáceos somente no pH 9. Nas concentrações 5% de água de produção não ocorreu mortalidade dos organismos (Figura 12). Essa alteração dos pHs pode ter interferido nos compostos químicos das amostras podendo ocorrer interações entres os diferentes compostos presentes nas amostras, alterando portanto a toxicidade dos poluentes.

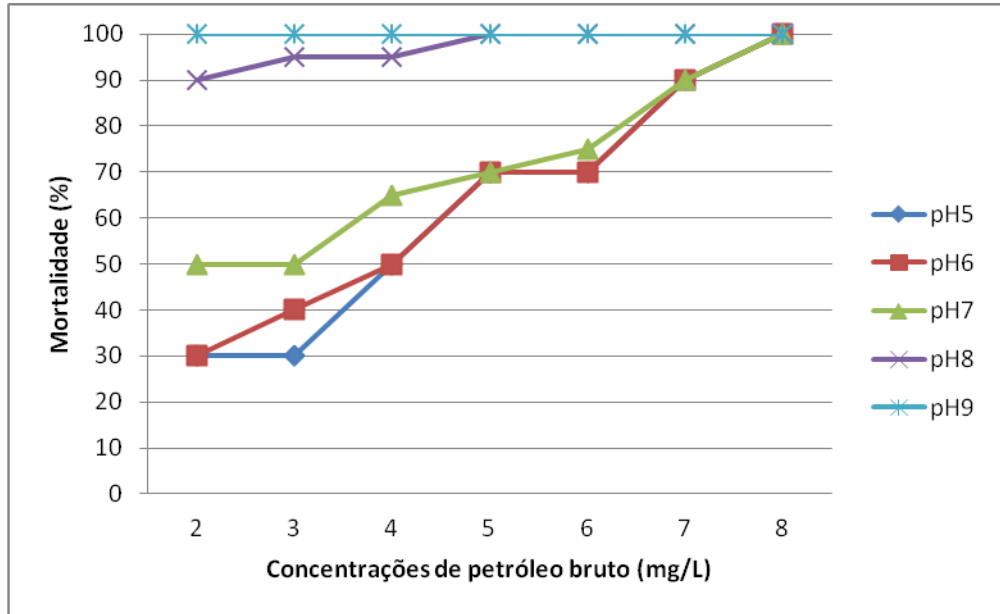


Figura 11: Mortalidade de *D. similis* no petróleo bruto frente a diferentes pHs.

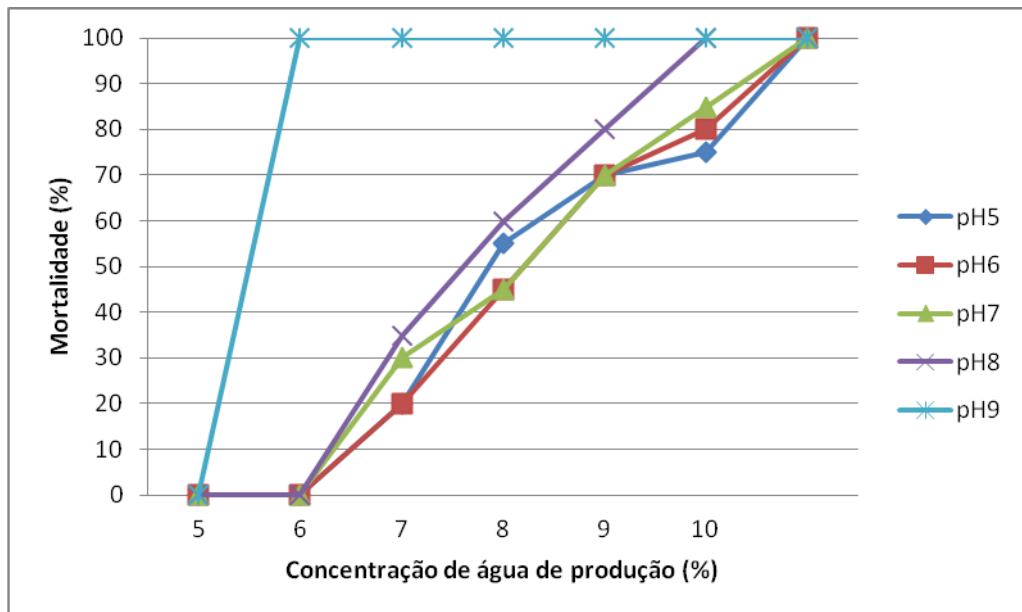


Figura 12: Mortalidade de *D. similis* em água de produção de petróleo frente a diferentes pHs.

Quanto aos resultados com as temperaturas na faixa de 15°C a 25°C observou-se que as temperaturas 15°C, 18°C e 25°C provocaram 100% de mortalidade dos microcrustáceos tanto no petróleo bruto como na água de produção, sendo que as temperaturas de sobrevivência foram de 20°C e 23°C. Nas soluções controles em temperaturas 18°C, 20°C e 23°C ocorreu 100% de sobrevivência dos microcrustáceos. Essa diferença na toxicidade com o aumento da temperatura também foi observada por Tatem *et al.* (1978) em um estudo sobre a toxicidade dos hidrocarbonetos de petróleo para o camarão *Palaemonetes pugio* no qual em temperaturas acima de 21°C a toxicidade aumentou aproximadamente 50%. Verificou-se que a mudança de temperatura foi o fator que mais alterou o metabolismo dos microcrustáceos. Para todos os seres vivos a temperatura prejudica a velocidade de suas reações metabólicas. Este parâmetro altera o tempo de desenvolvimento, a alimentação, o movimento, as taxas de reprodução e a longevidade dos animais, sendo que para os microcrustáceos o tempo de desenvolvimento pós-embrionário, ou seja, o período do indivíduo para atingir a maturidade é afetado também pela qualidade e quantidade de alimento (MELÃO, 1999). Portanto, os efeitos dos contaminantes juntamente com a variação na temperatura ocasionou um maior estresse ambiental sobre os microcrustáceos não permitindo sua sobrevivência.

6. CONCLUSÃO

O microcrustáceo *D. similis* apresentou grande sensibilidade aos poluentes avaliados, sendo mais sensível ao petróleo bruto dissolvido em água doce que para a água de produção, apresentando maior sensibilidade que outros organismos relatados na literatura.

O conjunto de variáveis ambientais como o pH e a temperatura também influenciaram a sobrevivência desses organismos possivelmente alterando a composição dos mesmos consequentemente modificando o seu efeito sobre os microcrustáceos.

A utilização de testes ecotoxicológicos na avaliação dos efeitos causados pelo petróleo bruto e pelos efluentes gerados no seu processo de produção é importante, pois poderão contribuir para melhor gestão das atividades das indústrias petrolíferas como forma de mitigar os impactos causados nos ecossistemas em situações de acidentes ambientais que possam ocorrer em águas de rios. Esses ensaios também podem auxiliar os órgãos ambientais no controle ambiental e ainda no gerenciamento de riscos ambientais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 12713: Ecotoxicologia aquática: toxicidade aguda - método de ensaio com *Daphnia spp* (Cladocera, Crustacea). Rio de Janeiro, 2004. p. 21.

ANDERSON, J. W.; Neff, J. M.; Cox, B. A.; Tatem, H. E.; Hightower, G. M. Characteristics of dispersions and water-soluble extracts of crude and refined oil and their toxicity to estuarine crustaceans and fish. **Marine Biology**, v. 27, p. 75-88, 1974.

ANDRÉA, M. M. **Bioindicadores ecotoxicológicos de agrotóxicos**. 2008. Disponível em: < http://www.infobibos.com/Artigos/2008_4/Bioindicadores/> Acesso em 27/08/2013.

API - American Petroleum Institute. Fate of spilled oil in marine waters. Health and Environmental Sciences Department. no. 4691, p. 43, 1999.

BARBIERI, E. Emprego de *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes) e *Artemia salina* (Crustacea) para determinar a toxicidade aguda da água de produção de petróleo em Sergipe, Brasil. **Biologia Geral e Experimental** 5, p. 26-29, 2004.

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

BREDOLAN, R. A. **Utilização do microcrustáceo *Kalliapseudes schubartii* em testes de ecotoxicologia**. 2004. p. 107. Dissertação (Mestrado em Biologia Marinha) – Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2004.

CALLISTO, M. & GONÇALVES, J. F. Jr. A vida nas águas das montanhas. **Ciência Hoje**, v.31, no.182, p. 68-71, 2002.

CAPUZZO, J. M. Biological effects of petroleum hydrocarbons: assessments from experimental results. In: BOESCH, D.F.; RABALAIS, N.N. (Eds): **Long-term environmental effects of offshore oil and gas development**. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1987. p. 343-410.

CARAPETO, C. Petróleo. In: **Poluição das águas**. Universidade Aberta. 1999. p. 139-167.

CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Teste de toxicidade aguda com *Daphnia similis* Claus, 1876 (Cladocera Crustacea). São Paulo.1991.33p. Norma técnica L5 018.

CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Principais acidentes internacionais. Disponível em: < <http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/emergencias-quimicas/panorama-geral/Principais-acidentes-internacionais.pdf>> Acesso em: 25/08/2013.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357 de 17 de março de 2005. Resoluções do Conselho Nacional do Meio Ambiente. Brasília: Ambiental, 2005.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 393 de 08 de agosto de 2007. Resoluções do Conselho Nacional do Meio Ambiente. Brasília: Ambiental, 2007.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 430 de 13 de maio de 2011. Resoluções do Conselho Nacional do Meio Ambiente. Brasília: Ambiental, 2011.

COSTA, R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em Ambientes Aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, no. 7, p. 1820-1830, 2008.

DURELL, G.; UTVIK, T. R.; JOHNSEN, S.; FROST, T.; NEFF, J. Oil well produced water discharges to the North Sea. Part I: Comparison of deployed mussels (*Mytilus edulis*), semi-permeable membrane devices, and the DREAM model predictions to estimate the dispersion of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Marine Environmental Research**, v.62, no.3, p. 194-223, 2006.

ENGELHARDT, F.R.; WONG, M.P.; DUEY, M.E. Hydromineral balance and gill morphology in rainbow trout *Salmo gairdneri*, acclimated to fresh and sea water as affected by petroleum exposure. **Aquatic Toxicology**, v.1, p.175-186, 1981.

FLYNN, S. A.; BUTLER, E. D.; VANCE, I. Produced water composition, toxicity and fate: a review of recent BP North Sea studies. In: REED, M. & JOHNSEN, S (Eds.) **Produced Water. Environmental Issues and Mitigation Technologies**. New York, Plenum Press. p. 69-80, 1996.

GABARDO, I. T. **Caracterização química e toxicológica da água produzida descartada em plataformas de óleo e gás na costa brasileira e seu comportamento dispersivo no mar**. 2007. p. 235. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

GUERRA, R. C. **Estudo do lodo gerado em reator biológico, pelo tratamento da água de produção do petróleo, no Terminal Marítimo Almirante Barroso, município de São Sebastião, SP. visando sua disposição final**. 2009. p. 125. Tese (Doutor em Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro.

GOMES, E. A. **Tratamento combinado da água produzida de petróleo por eletroflotação e processo fenton**. 2009. p. 84. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Programa de pós-graduação em Engenharia de Processos, Universidade Tiradentes, Aracaju, 2009.

GOULART, M.; CALLISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. **Revista da FAPAM**, v.2.1, p. 156-164, 2003.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. Trimmed Spearman Karber method for estimating median lethal concentration in toxicity bioassays. **Environment Sciences & Technology**, New York, v.11, n.7, p. 714-719, 1977.

HOLTH, T. F.; BECKIUS, J.; ZORITA, I.; CAJARAVILLE, M. P.; HYLLAND, K. Assessment of lysosomal membrane stability and peroxisome proliferation in the head kidney of Atlantic cod (*Gadus morhua*) following long-term exposure to produced water components. **Marine Environmental Research**, v. 72, no.3, p. 127-134, 2011.

HSIAO, S. I. C.; KITTLET, D. W.; FOY, M. G. Effects of crude oils and the oil dispersant Corexit on primary production of arctic marine phytoplankton and seaweed. **Environmental Pollution**, v.15, 1978.

IHARA, P. M. **Aplicação de ensaios ecotoxicológicos com diferentes organismos-teste na determinação da toxicidade da água produzida**. 2008, p. 82. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Física, Química e Geológica) - Universidade Federal do Rio Grande, 2008.

ITOPF - International Tanker Owners Pollution Federation Limited. Oil Tanker Spill Statistics 2012. <<http://www.itopf.com/information-services/data-and-statistics/statistics/#no>> Acesso em: 28/08/2013.

ITOPF - International Tanker Owners Pollution Federation Limited. Disponível em: <<http://www.itopf.com/marine-spills/>>. Acesso em: 27/08/2013.

KOLESNIKOVAS, C.; OLIVEIRA, E.; DUARTE, U. Avaliação de risco toxicológico para hidrocarbonetos totais de petróleo em forma fracionada aplicada à gestão e monitoramento de água subterrânea em um complexo industrial. **Águas Subterrâneas**, v.23, n.01, p.31-44, 2009.

LOPES, A.; PIEDADE, M. T. F. Estabelecimento de *Echinochloa polystachya* (HBK) Hitchcock (Poaceae) em solo de várzea contaminado com petróleo de Urucu. **Revista Acta Amazonica**, v. 39, n. 3, p. 583-590, 2009.

MAGALHÃES, D. P.; FILHO, A. S. F. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasileira**, v.12, no. 3, p. 355-381, 2008.

MARANHO, L. T.; GALVÃO, F.; PREUSSLER, K. H.; MUNIZ, G. I. B.; KUNIYOSHI, Y. S. Efeitos da poluição por petróleo na estrutura da folha de *Podocarpus lambertii* Klotzsch ex Endl., Podocarpaceae. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 3, p. 615-624, 2006.

MELÃO, M. G. G. Desenvolvimento e aspectos reprodutivos de cladóceros e copépodos de águas continentais brasileiras. POMPÊO, M. L. M. (org.) **Perspectivas da Limnologia no Brasil**. São Luís: Gráfica e Editora União, p. 45-57, 1999.

MMA – Ministério do Meio Ambiente. Informação Técnica ELPN/IBAMA nº 001/2006. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/processos/C657C5D3/InfTec001_2006.pdf> Acesso em: 28/08/2013.

MATSUMURA-TUNDISI, T. Occurrence of species of the genus *Daphnia* in Brazil. **Hydrobiologia**, v. 112, p. 161-165, 1984.

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

NEFF, J. M. Bioaccumulation in Marine Organisms. Effects of contaminants from Oil Well Produced Water. Oxford, **Elsevier Science**. p. 468, 2002.

OGP - The International Association of Oil & Gas Producers. Fate and effects of naturally occurring substances in produced water on marine environment. n. 364, 36p, 2005.

OLIVEIRA, R. C. G.; OLIVEIRA, M. C. K. Remoção de contaminantes tóxicos dos efluentes líquidos oriundos da atividade de produção de petróleo no mar. **Boletim Técnico da Petrobras**, v.43, n.2, p.129-136, 2000.

OROS, D. R.; ROSS, J. R. M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in bivalves from the San Francisco estuary: spatial distributions, temporal trends, and sources (1993-2001). **Marine Environmental Research**. v. 60, p. 466-488, 2005.

PAUKA, L. M. **Avaliação dos efeitos embriotóxicos e da biotransformação da fração solúvel do petróleo em água em peixe zebra (*Danio rerio* – Hamilton, 1822)**. 2007. p. 28. Dissertação (Mestre em Farmacologia) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, do Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

POFFO, I. R. F. **Vazamentos de óleo no litoral norte do estado de São Paulo: análise histórica (1974-1999)**. 2000. p. 133. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Programa de pós-graduação em ciência ambiental, Universidade de São Paulo.

PINTO, E. D. C. P.; LEITE, D. A. N. O.; OLIVEIRA, V. J. A.; ANGELIS, D. F. Toxicidade do petróleo bruto sobre *Daphnia similis* (Crustacea, Cladocera) em água de rio. In: Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, 12, 2012, Porto de Galinhas. **Anais do XII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia**, Porto de Galinhas, 2012. p. 437.

RODRIGUES, R. V. **Efeito agudo e avaliação histopatológica de larvas do peixe-rei marinho *Odontesthes argentinensis* expostas a fração solúvel do petróleo, diesel e gasolina em água**. 2009. p.42. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande, 2009.

RODRIGUES, T. T. **Os efeitos do solo contaminado com petróleo na estrutura anatômica e estado nutricional do lenho jovem de *Campomanesia xanthocarpa* Berg (Myrtaceae) e *Sebastiania commersoniana* (Baillon) Smith & Downs (Euphorbiaceae).** 2005. p. 154. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) - Centro de Ciências Florestais e da Madeira, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

RUPERT, E.E; FOX, R.F.; BARNES, R.D. **Zoologia dos invertebrados: uma abordagem funcional evolutiva.** 7^a. Ed., São Paulo, Roca, 2005.

SILVEIRA, M.P. **Aplicação do biomonitoramento para avaliação da qualidade da água em rios. Embrapa Meio Ambiente - Documentos 36.** Jaguariúna, SP, 2004. Disponível em: <http://www.cnpma.embrapa.br/download/documentos_36.pdf> Acesso em: 27/08/2013.

SOUZA, M. R. **Influências ambientais e biológicas sobre organismos zooplanctônicos e sua utilização como bioindicadores.** 2012. p. 42. Monografia (Licenciatura em Ciências Naturais) - Universidade de Brasília - UnB, Campus Planaltina.

STAGG, R. G., GORE, D. J., WHALE, G.F., KIRBY M, F., BLACKBURN, M., BIFIELD, S., McINTOSH, A. D., VANCE, I., FLYNN, S. A., FOSTER, A. Field evaluation of toxic effects and dispersion of produced water discharges from North Sea oil platforms. In: REED, M. & JOHNSEN, S (Eds.) **Produced Water. Environmental Issues and Mitigation Technologies.** New York, Plenum Press. p. 81-100, 1995.

STEPHENS, S. M.; FRANKLING, S. C.; STAGG, R. M.; BROWN, J. A. Sub-lethal effects of exposure of juvenile turbot to oil produced water. **Marine Pollution Bulletin**, v. 40, no.11, p.928-937, 2000.

STROMGREN, T.; SORSTROM, S. E.; SCHOU, L.; KAARSTAD, I.; AUNAAS, T.; BRAKSTAD, O. G.; JOHANSEN, O. Acute toxic effects of produced water in relation to chemical composition and dispersion. **Marine Environmental Research**, v.40, n.2, p.147-169, 1995.

SUNDT, R. C.; PAMPANIN, D. M.; GRUNG, M.; BARŠIENE, J.; RUUS, A. PAH body burden and biomarker responses in mussels (*Mytilus edulis*) exposed to produced water from a North Sea oil field: Laboratory and field assessments. **Marine Pollution Bulletin**.v.62, no.7, p. 1498-1505, 2011.

SZEWCZYK, S. B. O. **Processos envolvidos em um derramamento de óleo no mar.** Artigo. Seminário e Workshop em Engenharia Oceânica (SEMENGO). FURG, Rio Grande, 2006.

TATEM, H. E.; COX, B. A.; ANDERSON, J. W. The toxicity of oils and petroleum hydrocarbons to estuarine crustaceans. **Journal Estuarine and Coastal Marine Science**. vol. 6, 1978.

TEIXEIRA, P. W.; MEDRONHO, R. A. **Vazamento de óleo em cursos d'água: uma análise com CFD**. 4º PDPETRO, Campinas, SP. 2007.

UNEP – United Nations Environment Programme. Determination of petroleum hydrocarbons in sediments. Reference Methods for Marine Pollution Studies, no. 20, p. 75, 1992.

VEGUERIA, S. F. J.; GODOY, J. M.; MIEKELEY, N. Environmental impact studies of barium and radium discharges by produced waters from the “Bacia de Campos” oil-field offshore platforms, Brazil. **Journal of Environmental Radioactivity**, v.62, p.29-38, 2002

VEIL, J. A., PUDER, M. G., ELCOCK, D., REWEIK, R. J. Jr. **A white paper describing produced water from production of crude oil, natural gas, and coal bed methane**. Reported prepared by Argonne National Laboratory for U.S. Department of Energy National Energy Technology Laboratory. p.87, 2004.

VERA, G; TAM, J; PINTO, E. Efectos ecotoxicológicos Del petróleo crudo, diesel 2 y kerosene sobre el crecimiento poblacional de la microalga *Chaetoceros gracilis* (Schütt). **Revista Ecologia Aplicada**, vol. 8. 2009.

VIEIRA, F.C.S. **Toxicidade de hidrocarbonetos monoaromáticos do petróleo sobre *Metamysidopsis elongata atlantica* (Crustacea: Mysidacea)**. 2004. p.72. Tese (Mestre em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

WIECZOREK, A. **Efeito do Efluente da Refinaria de Petróleo REPLAN/PETROBRÁS sobre a Dinâmica populacional de *Daphnia similis***. 2003. Trabalho de conclusão de curso. (Especialização em ecotoxicologia aquática) – Instituto de Biociências – IB – UNESP, Rio Claro, 2003.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. São Carlos, RiMa, 2006.

ZIOLLI, R. L. Aspectos ambientais envolvidos na poluição marinha por petróleo. **Revista Saúde e Ambiente**, v.3, n.2, dez. 2002.